

ЖЕНСКОЕ БЕСПЛОДИЕ КАК МНОГОФАКТОРНАЯ ПРОБЛЕМА**Ю.А. Лызикова**

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

FEMALE INFERTILITY AS A MULTI-FACTOR PROBLEM**Y.A. Lyzikova**

Educational Institution "Gomel State Medical University"

Реферат

Цель. Определить уровень половых гормонов, экспрессию CD56 в эндометрии, оценить биоценоз влагалища у пациенток с бесплодием.

Материалы и методы. Выполнено проспективное «случай-контроль» исследование. В исследование включено 55 пациенток репродуктивного возраста, 40 пациенток с бесплодием составили основную группу, 15 фертильных женщин – группу сравнения. В сыворотках крови методом иммуноферментного анализа оценена концентрация гормонов (ФСГ, ЛГ, тестостерон, пролактин, эстрадиол, прогестерон). Иммуногистохимическое окрашивание биоптатов эндометрия проводили по стандартным протоколам с использованием первичных антител к CD56. Для оценки влагалищной флоры определяли общую бактериальную массу, содержание лактобактерий, анаэробов, дрожжеподобных грибов, микоплазм, факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Результаты. Установлено, что нарушение репродуктивной функции ассоциировано с повышением уровня эстрадиола ($p=0,03$) и пролактина ($p<0,001$) у пациенток основной группы. У пациенток с бесплодием концентрация лактобактерий составила 6,35 (5,25; 7,30) Лг г.э., в группе сравнения – 7,84 (6,25; 8,25) Лг г.э. ($p=0,05$). У пациенток с бесплодием отмечено преобладание облигатно-анаэробной микрофлоры в биотопе влагалища. Так, в основной группе сочетание ДНК *Megasphaera* spp.+*Veillonella* spp.+*Dialister* spp. выявлено у 11 (27,50%) пациенток ($\chi^2=5,16$, $p=0,02$), количественный уровень микроорганизмов составил 2,30 (0,00; 7,30) ($p=0,01$). ДНК *Atopobium vaginae* выделена у 10 (25,00%) пациенток основной группы ($\chi^2=4,58$; $p=0,03$). При иммуногистохимическом исследовании эндометрия хронический эндометрит диагностирован у 31 (77,50%) пациентки с бесплодием и у 1 (7,14%) пациентки группы сравнения ($\chi^2=22,50$, $p<0,001$). Медиана экспрессии CD56 составила 15,30 (12,60; 18,60) в основной группе и 4,90 (4,00; 5,60) в группе сравнения ($p<0,001$).

Заключение. Полученные данные дают основания рассматривать в едином комплексе нарушения биоценоза, изменения локального иммунитета и гормональные нарушения у пациенток с бесплодием.

Ключевые слова: бесплодие, хронический эндометрит, пролактин, эстрадиол, CD56.

Abstract

Purpose. To determine the level of sex hormones, the expression of CD56 in the endometrium, to evaluate the vaginal biocenosis in patients with infertility.

Materials and methods. A prospective case-control study was completed. The study included 55 patients of reproductive age, 40 patients with infertility made up the main group, 15 fertile women - the comparison group. The concentration of hormones (FSH, LH, testosterone, prolactin, estradiol, progesterone) was evaluated in blood serum by enzyme-linked immunosorbent assay. Immunohistochemical staining of endometrial biopsies was carried out according to standard protocols using primary antibodies to CD56. To assess the vaginal flora, the total bacterial mass, the content of lactobacilli, anaerobes, yeast-like fungi, mycoplasmas, and facultative anaerobic microorganisms were determined.

Results. It was found that reproductive dysfunction is associated with the increased levels of estradiol ($p=0,03$) and prolactin ($p<0,001$) in patients of the main group. In patients with infertility the concentration of lactobacilli was 6,35 (5,25; 7,30) Lg h.e., in the comparison group - 7,84 (6,25; 8,25) Lg h.e. ($p=0,05$). The patients with infertility noted a predominance of obligate-anaerobic microflora in the biotope of the vagina. In the main group the combination of DNA *Megasphaera* spp.+*Veillonella* spp.+*Dialister* spp. was found in 11 (27,50%) patients ($\chi^2=5,16$, $p=0,02$), the quantitative level of microorganisms was 2,30 (0,00; 7,30) ($p=0,01$). *Atopobium vaginae* DNA was found in 10 (25,00%) patients of the main group ($\chi^2=4,58$; $p=0,03$). In the immunohistochemical study of the endometrium chronic endometritis was diagnosed in 31 (77,50%) patients with infertility and in 1 (7,14%) patient in the comparison group ($\chi^2=22,50$, $p<0,001$). The median of CD56 expression was 15,30 (12,60; 18,60) in the main group and 4,90 (4,00; 5,60) in the comparison group ($p<0,001$).

Conclusion. The data obtained give the basis to consider in a single complex the abnormalities of biocenosis, changes in local immunity and hormonal disorders in patients with infertility.

Key words: infertility, chronic endometritis, prolactin, estradiol, CD56.

ВВЕДЕНИЕ

Среди проблем репродукции особое место занимает бесплодие, частота которого достигает 15% и не имеет тенденции к снижению [1, 2]. Одним из этиологических факторов нарушения репродуктивной функции, бесплодия, неудачных попыток является хронический эндометрит [3, 4, 5]. Несмотря на значительные успехи в области вспомогательных репродуктивных технологий в преодолении бесплодия, частота наступления беременности не превышает 35% [6, 7]. Наименее изученными являются иммунологические аспекты неудач имплантации. Большое значение для формирования механизмов толерантности к антигенам плода принадлежит Т-лимфоцитам CD56, учитывая их естественную киллерную функцию, у пациенток с привычным невынашиванием наблюдается увеличение содержания указанных клеток в сыворотке крови [8]. Однако, учитывая, что диалог между эмбрионом и иммунной системой матери проявляется имплантацией в эндометрий, целесообразно оценивать экспрессию киллерных лимфоцитов непосредственно в эндометрии. При обследовании бесплодных пациенток необходимо исключить нарушение биоценоза влагалища, поскольку нередко он сопровождается воспалительными поражениями верхних отделов генитального тракта, приводящих к бесплодию [9, 10]. Как известно, фертильность человека регулируется каскадом высококоординированных и синхронизированных взаимодействий, вовлекающих функциональную ось гипоталамус-гипофиз-гонады, поэтому для обследования бесплодных пациенток традиционно изучается уровень тропных половых гормонов [11, 12]. Таким образом, бесплодие представляет собой актуальную проблему, требующую исследования многих факторов, что позволит повысить эффективность лечебных мероприятий.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить уровень половых гормонов, экспрессию CD56 в эндометрии, оценить биоценоз влагалища у пациенток с бесплодием.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполнено проспективное «случай-контроль» исследование. Критерии включения в исследование: возраст от 18 до 45 лет, бесплодие, прегравидарная подготовка, индекс массы тела от 20 до 30. Критерии исключения: возраст менее 18 и более 45 лет, прием гормональных лекарственных средств на момент исследования, злокачественные новообразования в анамнезе, индекс массы тела более 30, наружный генитальный эндометриоз, терапия кортикостероидами, антифосфолипидный синдром.

В исследование включено 55 пациенток репродуктивного возраста (40 пациенток – основная группа, 15 – группа сравнения). Медиана среднего возраста обследованных пациенток основной группы составила 29,00 (26,00; 30,08) лет, в группе сравнения 26,80 (25,54; 29,00) лет. Всеми пациентками, участвовавшими в ис-

следовании, было подписано добровольное информированное согласие. Биопсию эндометрия у пациенток обеих групп производили с помощью аспирационной кюретки ProfiCombi («Симург», Беларусь). Биоптаты фиксировали в 10% нейтральном формалине с фосфатным буфером. Проведенный материал заливали в парафиновые блоки, на ротаторном микротоме Microm HM 304 E (Thermo Scientific, Германия) изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм, которые в дальнейшем монтировались на предметные силанизированные стекла Thermo SuperFrost (Thermo Scientific, Германия). Иммуногистохимическое окрашивание проводили по стандартным протоколам с использованием первичных антител к CD56 (ready-to-use, Diagnostic Biosystems, США) и системы визуализации Uno Vue Mouse/Rabbit Detection System Kit (Diagnostic Biosystems, США). Исследование экспрессии изучаемого иммуногистохимического маркера проводилось в трех неперекрывающихся полях зрения, при увеличении $\times 400$ с использованием микроскопа Nikon Eclipse 50i (Nikon, Япония). Результаты исследования эндометрия представлены в виде количества позитивных клеток в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 400$. Результаты представлены в виде Me (25%; 75%). Определение концентрации гормонов в сыворотке крови проводили с использованием наборов ЗАО «ВекторБест» и ООО «Хема» (Россия) (согласно инструкции производителей) и микрочипов фотометра Sunrise Tecan (Австрия). Молекулярно-генетический анализ проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием наборов торговой марки «АмплиСенс» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Российская Федерация). Амплификацию и анализ данных проводили согласно инструкции производителя, используя амплификатор Rotor-Gene 3000 «CorbettResearch», Австралия. Использован набор для молекулярно-генетического тестирования «Фемофлор-16» («ДНК-Технология», Российская Федерация).

Сравнительный анализ между группами исследования проводился с использованием методов непараметрической статистики. Для определения статистической значимости различий анализируемых групп применяли тест Манна-Уитни. При анализе качественных признаков в группах сравнения использовался критерий χ^2 Пирсона. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0. [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди пациенток основной группы у 21 (52,50%) диагностировано вторичное бесплодие, у 19 (47,50%) – первичное. Среди пациенток с вторичным бесплодием у 15 (71,43%) пациенток в анамнезе были роды, у 6 (38,57%) беременности завершились самопроизвольным выкидышем, у 3 (14,29%) была замершая беременность, у 1 (4,76%) – внематочная беременность, у 1 (4,76%) – медицинский аборт. Среди пациенток группы сравнения у 4 (26,67%) в анамнезе были роды, у 11 (73,33%) пациенток беременностей не было. Все пациентки основной груп-

пы предъявляли жалобы на отсутствие беременности. Жалобы на нерегулярные менструации и выделения из половых путей встречались с одинаковой частотой – 6 (15,00%) среди пациенток основной группы. Тазовую боль отметили 2 (5,00%) пациенток с бесплодием, зуд в области промежности – 1 (2,50%). Среди пациенток группы сравнения жалобы на тазовую боль были у 3 (20,00%), на болезненные менструации – у 1 (6,67%). Анализ гинекологической патологии показал высокую частоту гинекологической патологии у пациенток обеих групп. Хронический сальпингоофорит перенесли 10 (25,00%) пациенток основной группы и 4 (26,67%) – группы сравнения. Фоновые заболевания шейки матки были у 10 (25,00%) бесплодных пациенток и у 5 (33,33%) пациенток контрольной группы. Предраковые заболевания шейки матки встречались только у пациенток основной группы – 2 (5,00%). Анализ перенесенных оперативных вмешательств выявил высокую частоту внутриматочных манипуляций у пациенток основной группы: у 4 (10,00%) было выскабливание полости матки, у 3 (7,50%) – перенос эмбрионов, у 2 (5,00%) – гистероскопия с последующим выскабливанием слизистой полости матки. Таким образом, внутриматочные манипуляции были у 9 (22,50%) пациенток основной группы, у пациенток группы сравнения указанные хирургические операции не проводились ($\chi^2=4,04$; $p=0,05$).

Между группами не выявлено статистически значимых различий при сравнении уровней тропных гормонов, тестостерона, прогестерона. Уровень пролактина был статистически значимо выше у пациенток основной группы – 544,67 (366,28; 782,08) мМЕ/л, по сравнению с пациентками группы сравнения – 217,90 (166,72; 292,90) мМЕ/л ($p<0,001$). Обращает на себя внимание, что у пациенток обеих групп уровень эстрадиола был в пределах нормальных значений, однако при сравнении уровней гормона между группами получены статистически значимые различия ($p=0,03$) (таблица 1).

Анализируя биоценоз влагалища, установлено, что у пациенток основной группы общая бактериальная масса составила 7,11 (6,72; 7,40) Лг г.э., у пациенток группы сравнения – 6,8 (5,50; 6,95). При сравнении числа лактобактерий выявлены статистически значимые различия между группами: у пациенток основной группы – 6,35 (5,25; 7,30), в группе сравнения – 7,84 (6,25; 8,25) Лг г.э. ($p=0,05$). Анализ качественного состава микрофлоры половых путей выявил преобладание облигатных анаэробных микроорганизмов у пациенток с бесплодием. ДНК *Atopobium vaginae* выделена у 10 (25,00%) пациенток основной группы ($\chi^2=4,58$; $p=0,03$), количественный уровень

Atopobium vaginae составил 2,62 (0,60; 6,32) Лг г.э., в контрольной группе ДНК данного микроорганизма не выявлена ($p=0,08$). В основной группе сочетание ДНК *Megasphaera* spp.+*Veillonella* spp.+*Dialister* spp. выявлено у 11 (27,50%) пациенток ($\chi^2=5,16$, $p=0,02$), количественный уровень микроорганизмов составил 2,30 (0,00; 7,30) Лг г.э. ($p=0,01$). При сравнении между группами количественного уровня дрожжеподобных грибов, микоплазм, факультативно-анаэробных микроорганизмов не отмечено статистически значимых различий. При иммуногистохимическом исследовании эндометрия хронический эндометрит диагностирован у 31 (77,50%) пациентки с бесплодием и у 1 (7,14%) пациентки группы сравнения ($\chi^2=22,50$, $p<0,001$). Медиана экспрессии CD56 составила 15,30 (12,60; 18,60) в основной группе и 4,90 (4,00; 5,60) в группе сравнения ($p<0,001$).

ВЫВОДЫ

1. У пациенток с бесплодием отмечается высокая частота внутриматочных манипуляций ($\chi^2=4,04$; $p=0,05$).
2. Уровень пролактина статистически значимо выше у пациенток основной группы – 544,67 (366,28; 782,08) мМЕ/л, по сравнению с пациентками группы сравнения – 217,90 (166,72; 292,90) мМЕ/л ($p<0,001$). У пациенток обеих групп уровень эстрадиола был в пределах нормальных значений, однако при сравнении уровней гормона между группами получены статистически значимые различия ($p=0,03$).
3. При сравнении числа лактобактерий выявлены статистически значимые различия между группами: у пациенток основной группы – 6,35 (5,25; 7,30), в группе сравнения – 7,84 (6,25; 8,25) Лг г.э. ($p=0,05$).
4. ДНК *Atopobium vaginae* выделена у 10 (25,00%) пациенток основной группы ($\chi^2=4,58$; $p=0,03$), количественный уровень *Atopobium vaginae* составил 2,62 (0,60; 6,32) Лг г.э., в контрольной группе ДНК данного микроорганизма не выявлена ($p=0,08$). В основной группе сочетание ДНК *Megasphaera* spp.+*Veillonella* spp.+*Dialister* spp. выявлено у 11 (27,50%) пациенток ($\chi^2=5,16$, $p=0,02$), количественный уровень микроорганизмов составил 2,30 (0,00; 7,30) Лг г.э. ($p=0,01$).
6. При иммуногистохимическом исследовании эндометрия хронический эндометрит диагностирован у 31 (77,50%) пациентки с бесплодием и у 1 (7,14%) пациентки группы сравнения ($\chi^2=22,50$, $p<0,001$). Медиана экспрессии CD56 составила 15,30 (12,60; 18,60) в основной группе и 4,90 (4,00; 5,60) в группе сравнения ($p<0,001$).

Таблица 1. Уровни гормонов обследованных пациенток

Уровень гормонов	Основная группа (n=40)	Группа сравнения (n=15)	p
ЛГ (мМЕ/мл)	4,85 (3,94; 6,22)	5,79 (4,03; 7,88)	$p=0,42$
ФСГ (мМЕ/мл)	7,22 (5,56; 8,92)	5,46 (4,59; 7,71)	$p=0,07$
Пролактин (мМЕ/л)	544,67 (366,28; 782,08)	217,90 (166,72; 292,90)	$p<0,001$
Тестостерон (нмоль/л)	1,50 (0,61; 2,49)	0,98 (0,56; 2,28)	$p=0,50$
Эстрадиол (нмоль/л)	0,23 (0,22; 0,24)	0,21 (0,19; 0,23)	$p=0,03$
Прогестерон (нмоль/л)	50,11 (8,50; 160,59)	18,53 (7,78; 83,65)	$p=0,46$

Полученные данные дают основания рассматривать в едином комплексе нарушения биоценоза, изменения локального иммунитета и гормональные нарушения у пациенток с бесплодием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борцвадзе, Ш.Н. Современный взгляд на проблему внутриматочных синехий при бесплодии/Ш.Н. Борцвадзе [и др.] //Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2013. – №5. – С. 11–15.
2. Efficacy of hysteroscopy in improving reproductive outcomes of infertile couples: a systematic review and meta-analysis / A.D.S. Sardo [et al.] // Human Reproduction Update. – 2016. – Vol.22, No.4. – P. 479–496.
3. Модулирование локальной экспрессии факторов врожденного иммунитета у пациенток с хроническим эндометритом и бесплодием/Ю.Э. Доброхотова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2019. - №5. – С.125-132.
4. Электронно-микроскопическая характеристика маточно-плацентарного ложа у женщин с урогенитальной инфекцией на раннем сроке беременности /С.А. Михалев [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2015. – №4. – С. 15-19.
5. Хронический эндометрит – показание для прегравидарной подготовки/Г.М. Савельева [и др.] // Клиническая практика. – 2018. – №2. – С. 36-41.
6. Prevalence and impact of chronic endometritis in patients with intrauterine adhesions: a prospective cohort study/ Y.Chen [et al.]//J Minim Invasive Gynecol. – 2017. – №24. – P. 74–79.
7. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy / E. Cicinelli [et al.] //Human Reproduction. – 2015. –Vol. 30. – P. 323–330.
8. Амян, Т.С. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с цитотоксической, киллерной и регуляторной функцией у женщин с повторными неудачами имплантации в программах вспомогательных репродуктивных технологий/Амян, Т.С., Кречетова, Л.В., Перминова, С.Г., Вторушина, В.В. // Акушерство и гинекология. – 2017. – №12. – С.78 - 83.
9. Жуковская, И.Г. Хронический неспецифический вагинит как маркер заболеваний репродуктивной системы / И.Г. Жуковская, Е.А. Сандакова // Доктор.ру. – 2012. - №7 (75). – С. 15-19.
10. Тапильская, Н.И. Обоснование эффективности антибактериальной терапии в лечении хронической воспалительной болезни матки/Н.И. Тапильская, С.А. Карпеев, С.Н. Гайдуков//Фармакотерапия в дерматовенерологии – 2015. – №2. – С. 130-138.
11. Менжинская, И.В. Ассоциация антител к гонадотропинам и женским половым гормонам с нарушениями репродуктивной функции / И.В. Менжинская, Л.В. Ванько // Акушерство и гинекология. – 2017. – №9. – С. 20-27.
12. Овсянникова, Т.В. Алгоритмы диагностики и ведения пар с бесплодием/Т.В. Овсянникова, И.А. Куликов // Лечение и профилактика. – 2015. – №2 (14). С. 34 – 37.